



# **Technical Language Service**

Translations From And Into Any Language

## **GERMAN / ENGLISH TRANSLATION OF**

**Unexamined German Patent Application**

**DE 196 25 137 A 1**

**Use of a Bioluminescence Test for the Detection of Microorganisms in  
Dispersions that contain Polymers and/or Pigments**

**Your Ref: 110802-11**

**For: Eastman Chemical Company**

(19) Federal Republic  
of Germany



German  
Patent and  
Trademark Office

(12) **Unexamined  
German Application**

(10) **DE 196 25 137 A 1**

(21) Appl. No.: 196 25 137.0

(22) Appl. Date: 24 Jun 1996

(43) Laid-Open Date: 08-Jan 1998

(51) Int Cl.<sup>6</sup>:

**C 12 Q 1/66**

**G 01 N 33/44**

Laid open with the consent of the applicant in accordance with §31, section 2, subparagraph 1 of the patent act.

(71) **Applicant:**

BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

(74) **Representative:**

Kinzebach et al., 81679 Munich

(72) **Inventors:**

Balk, Roelof, Dr., 67459 Böhl-Ingelheim, DE; Eipel,  
Heinz, 64625 Bensheim, DE; Preßler, Uwe, Dr.,  
67165 Waldsee, De

(54) **[Title of the Invention]:** Use of a Bioluminescence Test for the Detection of Microorganisms in Dispersions that contain Polymers and/or Pigments

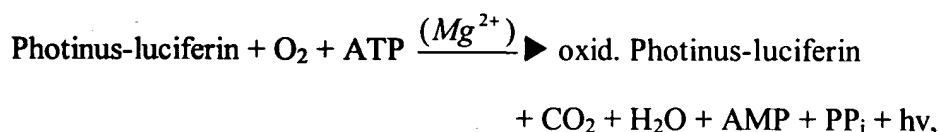
(57) **[Abstract]:** The invention relates to the use of a bioluminescence test for the detection of microorganisms in dispersions that contain polymers and/or pigments.

## Description

The invention relates to the use of a bioluminescence test for the detection of microorganisms in dispersions that contain polymers and/or pigments.

Bioluminescence reactions, in particular ATP-driven luminescence reactions, such as the luciferin/luciferase reactions, are well known, for example as described in Römpp, Chemie-Lexikon [chemistry encyclopedia], 9<sup>th</sup> edition, p. 425 or pp. 2552 and following. Luciferases is the name for various, structurally different enzymes from different organisms, with said enzymes belonging to the group of oxidoreductases [redox enzymes – translator] and sharing the common property of being capable of inducing bioluminescence as the result of the oxidation of luciferins. Luciferins are structurally completely differing natural compounds that generate bioluminescence in response to the effect of a luciferase.

The luciferin/luciferase reaction has been studied the most thoroughly in the American luminescent beetle *Photinus pyralis*, in which a luciferase comprising 550 amino acid residues catalyzes the following reaction:



with these definitions applying to the reaction scheme: ATP = adenosine-5'-triphosphate, AMP = adenosine-5'-monophosphate, PP<sub>i</sub> = inorganic diphosphate, hν = light, Photinus-luciferin = (S)-4,5-dihydro-2-(6-hydroxybenzothiazole-2-yl)-thiazole-4-carboxylic acid.

The first reaction step is a diphosphate cleavage and the formation of luciferyl-adenylate (anhydride between luciferin and AMP). The reaction of the enzyme, which has been cloned in the meantime, can be used, among other things, for the rapid and sensitive detection of ATP (up to a molar concentration of 10<sup>-11</sup>).

Since ATP constitutes the most important biological energy carrier, the luciferin/luciferase reaction can also be used for the detection of microorganisms, if these organisms have previously been subjected to lysis. "Lysis" within the context of the present invention is defined in the sense of cells being damaged in such a manner that they release ATP.

On the basis of PCT patent WO 96/07759 it is known that the lysis of microbial cells can be achieved by treatment with a boiling buffer, with solvents, with acids or with surfactants. With respect to the lysis with surfactants, it must be pointed out that a mixture consisting of non-ionic and cationic surfactants is not effective, because non-ionic surfactants protect bacteria against lysis caused by cationic surfactants (pg. 1, lines 25-28).

Furthermore, PCT patent WO 96/07759 describes a test kit, which contains luciferin, luciferase, a buffer as well as a surfactant-based lysis agent together with a medium-sized chain fatty acid. The 3 [sic] fatty acid serves the purpose of protecting the luciferase against inactivation by the surfactant-based lysis agent. The test kit is suited for the detection of ATP released from microorganisms. The patent does not mention special areas of application for this test kit.

A corresponding test kit is marketed by the applicant of WO 96/07759 (Celsis Corp. [GB]) in various forms (e.g. "Hygiene Monitoring Kit", "Low Decay Rate Bioluminescence Kit"). Each kit, however, contains the same surfactants as components of the lysing agent. The product specifications, for example for the "Low Decay Rate Bioluminescence Kit", state that the presence of surfactants in the samples to be tested, can interfere with the test itself. Furthermore, the product specifications list the quality control of foods, water, beverages, cosmetics and personal care products as well as the hygiene monitoring of cosmetic, pharmaceutical and biotechnological production facilities exclusively as areas of application.

The use of bioluminescence tests on the basis of a surfactant-induced lysis for the detection of microorganisms in foods and bodily fluids, such as milk, urine, blood, cerebrospinal fluid or saliva is also known on the basis of German patent DE 28 23 916 B.

There is also an announcement of a presentation entitled "The application of ATP technology in the adhesives and polymer dispersion industries" that is to be presented in England on 25/26 June 1996 within the context of the "International Symposium on Industrial Applications of Bioluminescence in Microbiology" by Dr. Michael Cresswell (National Starch & Chemical Co., Europe. How, for what purpose and with what methods the application of ATP technology is intended to be carried out, however, is not known.

Therefore, it must be assumed that bioluminescence tests based on surfactant-induced lysis cannot be used for the detection of microorganisms in dispersions that contain polymers and/or pigments, in particular not in dispersions that contain anionic or non-ionic surfactants. Our own studies confirm this prejudice insofar as a direct application was not possible with respect to dispersions with a solids concentration on 10 to 80 % by weight and a concentration of mostly anionic and/or non-ionic emulsifiers of 0.1 to 10 % by weight relative to the solids concentration.

Consequently, the detection of microorganisms in dispersions that contain polymers and/or pigments is generally carried out by way of growth tests, for example such as Easycult-TTC (can be obtained from Orion Diagnostics, Finland) or by way of agar plating. These methods, however, only work indirectly after addition of a culture medium and 24 to 48 hours of incubation at elevated temperatures (approx. 35 to 37°C). A particular disadvantage associated with these methods is the long waiting period between sampling and test results. Frequently, this results in the prophylactic use of disinfecting agents, which are expensive and not completely safe from a toxic perspective, for example, when they are being used in dispersions for paints. In addition, preservatives, in higher concentrations, can negatively influence the material properties of the dispersions.

Contamination with microorganisms, however, cannot simply be accepted, since such contamination, aside from the malodor associated with the contamination, also results in serious technical disadvantages. Contaminated dispersions may exhibit altered flow properties, which can render them unfit for use in industrial lacquer or coating plants, which are set to certain flow properties of the dispersions. If printing paper is coated with contaminated dispersions, then this paper may tear on the fast rotation machines used in print shops as a result of the deteriorated material properties of the dispersion. Films [or: foils – translator] produced with contaminated dispersions can become brittle or discolored. Since the microorganisms in the dispersions form gas bubbles, pinholes may form, for example in lacquer coatings on automobile chassis. Organic

acids, which are produced by the microorganisms and which are therefore present in the dispersions that contain polymers and/or pigments, can corrode storage tanks, drums or other metal objects.

Consequently, it is desirable that it be possible to reliably and quickly detect the microbial contamination of dispersions that contain polymers and/or pigments so that the use of disinfection agents can be limited to a minimum.

Surprisingly, it has now been found that microbial contaminations can be detected reliably and quickly even in surfactant-containing dispersions that contain polymers and/or pigments by means of a bioluminescence test based on a surfactant-induced lysis.

Consequently, the object of the invention is the use of a bioluminescence test for the detection of microorganisms in dispersions that contain polymers and/or pigments.

In accordance with the invention, the bioluminescence test is suitable for the testing of all kinds of aqueous dispersions that contain polymers and/or pigments. Preferably, however, it is suited for the testing of dispersions based on vinyl chloride, butadiene and styrene as well as on the basis on esters on an  $\alpha,\beta$ -ethylenic unsaturated  $C_3$ - $C_6$  mono- or dicarboxylic acid, such as acrylic acid, methacrylic acid, maleic acid, fumaric acid or itaconic acid, with  $C_1$ - $C_{30}$  alkanols, in particular  $C_1$ - $C_{12}$  alkanols, such as methanol, ethanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, isobutanol, sec.-butanol, tert.-butanol, 2-ethylhexyl, decanol, dodecanol, etc. Preferred acrylates are those on the basis of (meth)acrylic acid with  $C_1$ - $C_4$  alkanols, in particular  $C_4$ -alkanols.

The dispersions that contain polymers and/or pigments can be homopolymers or copolymers. The copolymers on the basis of the mentioned esters may contain at least one additional monomer polymerized into the molecule, such as (meth)acrylic acid, (meth)acrylamide,  $N$ - $C_1$ - $C_6$  alkyl- or  $N$ - $C_1$ - $C_6$ -hydroxylalkyl-substituted (meth)acrylamides, hydroxyalkyl-(methacrylates), for example hydroxyethyl(meth)acrylate, vinyl esters, for example vinyl acetate, vinyl propionate, vinyl-aromatic compounds, for example styrene,  $\alpha$ -methylstyrene, and olefins, for example, ethylene, propylene or butadiene, and (meth)acrylonitrile. Copolymers on a styrene basis may also contain at least one of the mentioned monomers (that are different from styrene) polymerized into the molecule. Styrene-butadiene and acrylate-styrene dispersions are particularly preferred.

The production of the useful<sup>TN</sup> dispersions that contain polymers and/or pigments, can be carried out in the conventional manner by free-radical suspension or emulsion polymerization in the presence of conventional initiators and emulsifiers of protective colloids, as is described, for example, in Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5<sup>th</sup> edition, vol. A21, pp. 373-393, or in Houben-Weyl, vol. XIV/1, Makromolekulare Stoffe [macromolecular substances], Georg-Thieme Publishers, Stuttgart, 1961, pp. 411-420 or pp. 192-208. Useful initiators, in particular, are peroxo compounds, such as hydrogen peroxide, alkali [metal] peroxodisulfates, hydroperoxides, dialkylperoxides, dibenzoylperoxide, etc. as well as azo compounds and redox initiators. Useful emulsifiers, for example, are ethoxylated mono-, di- and trialkyl phenols (degree of ethoxylation: 3 to 50, alkyl residue:  $C_4$ - $C_9$ ), ethoxylated fatty alcohols (degree of

---

<sup>TN</sup> Translation note: the German text uses the German equivalents of "useful" and "suitable" interchangeably, always in the sense of "useful." However, since the German text uses both terms, we have reflected the uses of "useful" and "suitable" in the translation as well.

ethoxylation: 3 to 50, alkyl residue: C<sub>8</sub>-C<sub>36</sub>), as well as, in particular, anionic emulsifiers, such as alkali and ammonium salts of alkyl sulfates or alkyl ether sulfates, of alkylsulfonic acids or alkyldiphenyloxide sulfonates. Bis(phenylsulfonic acid)ethers or their alkali or ammonium salts, which carry a C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> alkyl group on one or both aromatic rings, are additional suitable anionic emulsifiers. Polyvinyl alcohol, cellulose derivatives or polyvinylpyrrolidone in particular are suitable protective colloids.

In order to reduce the molecular weight, the polymerization can be carried out in the presence of conventional regulators [or: modifiers – translator]. Aldehydes or organic halogen or sulfur compounds such as formaldehyde, acetaldehyde, bromotrichloromethane, mercapto-ethanol, 2-ethylhexylthioglycolate, thioglycolic acid [or: mercaptoacetic acid – translator] or dodecylmercaptan in particular are useful regulators.

Another object of the invention is a method for the detection of microorganisms in dispersions that contain polymers and/or pigments, in which case the following steps are carried out:

- a) a sample of the dispersion is diluted with water,
- b) microorganism-lysing agents are added to the diluted sample and allowed to act,
- c) a mixture of luciferin and luciferase is added, and
- d) the luminescence of the sample is measured.

A sample is taken from the dispersion that is to be tested and the sample is then diluted in such a manner that a ratio by weight of approx. 1 part polymer to about 10 to 300 parts of water, preferably of approx. 1 part of polymer to approx. 100 to 200 parts of water is present. About 300 to 500 µL of this sample are placed in a suitable vessel, for example a small measuring tube, which in turn is placed into a sensitive luminometer furnished with photomultipliers. Then, microorganism-lysing agents are added, which are allowed to act for at least 5 to 20 seconds, preferably at least 10 seconds. The agents described in German Patent DE 28 23 916 B and in PCT patent WO 96/07759 as surface-active substances [surfactants – translator] can be used as microorganism-lysing agents. Cationic surfactants and surfactants with an in situ cationic action, for example ethoxylated amines, ethoxylated diamines, quaternary ammonium salts of an ethoxylated amine, as well as mixtures thereof, and fatty acid-polyethylene glycol esters, each of which can be used together with a fatty acid of medium chain length, are particular preferred. Especially preferred are cationic surfactants such as quaternary ammonium salts. Preferably, the surfactant concentration is approx. 0.01 to 5% by weight relative to the entire batch. Subsequently, about 50 to 150 µL, preferably 80 to 120 µL of a mixture consisting of a luciferin and a luciferase is added, with a mixture consisting of Photinus-luciferin and Photinus-luciferase being particularly preferred. The luminescence is then measured for at least 10 to 20 seconds, in particular for at least 15 seconds, with the result expressed, as is conventional in luminometry, in “relative light units” (RLU).

The following examples illustrate the invention, without, however, limiting the invention to said examples.

## **Example 1**

### **Comparison of the Rapid Bioluminescence Test with a Conventional Microbiological Growth Test (Easycult-TTC)**

Samples were taken from different polymer dispersions that were contaminated with microorganisms. Dispersions of styrene polymers as well as dispersion of acrylic acid ester – styrene copolymers were used. The exact composition of the polymers, the emulsifiers and initiators contained in the dispersions as well as the pH-range of the dispersions are listed in table 1. A set of reaction vessels and reagents sold by the Celsis Corp. as a “Hygiene Monitoring Kit” was used for the tests. The samples were diluted at a ratio of 1 : 100 with demineralized water (conductivity about 0.05  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) that was furthermore sterile-filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  microfilter. Based on a solids concentration of the dispersions of about 30 to 80% by weight, this [dilution – translator] resulted in a ratio by weight of approx. 1 part of polymer to about 125 to 333 parts of water. 400  $\mu\text{L}$  each of the diluted samples were pipetted into small measuring tubes, which were placed in a luminometer of type “Optocomp 1” (sold by Celsis Corp.). Thereafter, 200  $\mu\text{L}$  of a lysis reagent was added. The active components of this reagent essentially were cationic surfactants (0.2% by weight), predominantly quaternary ammonium salts of ethoxylated amines with 9 to 12 carbon atoms in the chain, and smaller amounts of anionic (0.05% by weight) as well as non-ionic (0.05% by weight) surfactants. Following a reaction period of 10 seconds, 100  $\mu\text{L}$  of the luciferin/luciferase mixture was added and the luminescence measured for a duration of 15 seconds after a waiting period of 0.5 seconds. The results of the measurements are shown in table 2. For purposes of a comparison, the results of the conventional growth test (Easycult-TTC) are also listed in table 2.

A sterile dispersion sample (null sample [or: reference sample – translator]) yielded an RLU-value of  $2.3 \times 10^2$ . The RLU-values listed in table 2 are clearly higher and therefore are significant with respect to the detection of microorganisms.

Table 1

Dispersion	Initiator <sup>1)</sup>	pH-range	Monomers <sup>2)</sup> (weight-%)	Emulsifiers <sup>3)</sup> (weight-%)	
				Type	Amount
D1	DIHP + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	9.9 – 10.5	66.0 Bu 34.0 S	KOleat <sup>TN</sup> Arylsulfonic acid condensate	3.90 0.80
D2	DIHP + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	10.1 – 10.9	61.0 Bu 39.0 S	KOleat Arylsulfonic acid condensate	3.70 1.10
D3	DIHP + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	10.1 – 10.9	58.0 Bu 42.0 S	KOleat Arylsulfonic acid condensate	3.50 1.30
D4	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	7.5 – 8.5	38.0 Bu 60.0 S 1.5 AS 0.5 IS	Fatty alcohol sulfonate	0.67
D5	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	6.0 – 7.0	34.5 Bu 60.5 S 3.5 AS 1.5 AM	Fatty alcohol sulfonate Bis(phenylsulfonic acid) ether	0.27 0.60
D6	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7.5 – 9	50.0 BA 46.0 S 2.5 AS 1.0 AM	Alkylphenol ether sulfate	1.32
D7	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	7.5 – 8.5	48.5 BA 48.3 S 1.3 AS 1.9 MAM	Polyvinylpyrrolidone Polyvinyl alcohol	1.47 2.62

<sup>TN</sup> Translator's Note: "KOleat" – unknown abbreviation or convention. This term is not defined at the end of table 1 or in the description of the invention detailing suitable emulsifiers.



Table 1 - continued

Dispersion	Initiator <sup>1)</sup>	pH-range	Monomers <sup>2)</sup> (weight-%)	Emulsifiers <sup>3)</sup> (weight-%)	
				Type	Amount
D8	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	7 - 8.5	68.4 BA 29.6 S 2.0 AM	Alkylphenol ether sulfate Ethoxylated octylphenol	0.75 0.48
D9	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	6 - 7	53.3 BA 28.9 AN 14.5 S 3.3 AS	Bis(phenylsulfonic acid)ether NaLS	0.38 0.19
D10	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	8.5 - 10	100 S	Ethoxylated octylphenol Arylsulfonate Ethoxylated alkylphenol	1.50 1.30 2.00
D11	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	6 - 7	31.1 Bu 64.0 S 3.4 AS 1.5 AM	Bis(phenylsulfonic acid)ether NaLS	0.60 0.25

1) DIHP = diisopropylbenzoylhydroperoxide, t-BHP = tert.-butylhydroperoxide

2) Bu = butadiene, AN = acrylonitrile, MAS = methacrylic acid, S = styrene, AS = acrylic acid, IS = itaconic acid,

AM = acrylamide, MAM = methacrylamide, BA = butylacrylate

3) NaLS = sodiumlaurylsulfate

**Table 2**

Dispersion	Growth Easycult-TTC discoloration <sup>1)</sup>	Rapid Luminescence Test RLU
D1	++	$3.5 \times 10^4$
D2	+	$4.0 \times 10^4$
D3	+	$2.1 \times 10^4$
D4	++	$5.6 \times 10^3$
D5	+++	$4.0 \times 10^2$
D6	+	$7.3 \times 10^3$
D7	++	$9.7 \times 10^2$
D8	+	$8.1 \times 10^3$
D9	+	$1.6 \times 10^3$
D10	+	$4.1 \times 10^2$
D11	++	$8.1 \times 10^2$

- 1)    +++ very strong red discoloration, ++ = strong red discoloration,  
       + = many red dots, o = trace, - = negative

### Example 2

#### Detection of Microorganisms in Samples with a Known Number of Microbes

Five samples were drawn from dispersion D6 (solids concentration of about 50% by weight), with said samples being sterile, because they were drawn directly from the production. One sample (0) was left as the null sample. Three partial samples each were taken from all other samples (D6-1 to D6-4), and were mixed with  $10^3$ ,  $10^6$  or  $10^8$  microorganisms per mL of sample of a freshly cultured stock suspension of the microorganisms (yeasts and bacteria)<sup>TN</sup>. D6-1 was doped with yeast cells of the genus *Candida tropicalis*, D6-2 and D6-4 were doped with gram-negative bacteria (*E. coli* or *Burkholderia cepacia*) and D6-3 was doped with gram-positive bacteria (*Rhodococcus erythropolis*). The null sample and partial samples were tested with conventional growth tests (agar plating or Easycult-TTC) and, following dilution with demineralized, sterile water at a ratio of 1: 50 (ratio by weight approx. 1 part of polymer to

<sup>TN</sup> **Translator's Note:** the German source text is potentially unclear at this point. The German text literally reads that "three partial samples were drawn [from each same D6-1 to D6-4] and doped with  $10^3$ ,  $10^6$  and  $10^8$  microorganisms...." This can be read to mean that the 3 partial samples drawn from each sample D6-1 to D6-4 were doped with the respective concentrations of microorganisms AFTER being drawn from samples D6-1 to D6-4, or that samples D6-1 to D6-4 were doped AND THEN the partial samples were drawn. The sentence starting with "Three partial samples were drawn....." suggests the former, while the next sentence starting with "D6-1 was doped...." suggests the latter.

approx. 100 parts of water), by means of the rapid luminescence test. The luminescence test was conducted as described in example 1, however by using the "Low Decay Rate Bioluminescence Kit" made by Celsis Corp. instead of the "Hygiene Monitoring Kit." The dopings of the D6-samples were detected by means of the luminescence test without exception. The values of the measured RLU were approximately one half to two orders of magnitude above the RLU value measured for the null sample. By contrast, the growth tests were unable to detect some of the contaminations. The measurement results for the individual samples are shown in table 3.

**Table 3**

Dispersion	Doping		Growth		Rapid Luminescence Test
	Sample	Target Amount	Agar plates	Easycult-TTC <sup>1)</sup>	Dilution 1:50 RLU
		Microbes/mL	Microbes/mL		
D6	0	-	-	-	$5.8 \times 10^2$
	D6-1	$10^3$	$1 \times 10^2$	-	$1.1 \times 10^3$
		$10^6$	$1 \times 10^5$	-	$1.3 \times 10^3$
		$10^8$	$1 \times 10^7$	o	$4.9 \times 10^3$
	D6-2	$10^3$	$2 \times 10^2$	o	$1.1 \times 10^3$
		$10^6$	$2 \times 10^4$	+	$2.2 \times 10^3$
		$10^8$	$4 \times 10^7$	+	$4.6 \times 10^4$
	D6-3	$10^3$	$2 \times 10^1$	o	$1.5 \times 10^3$
		$10^6$	$2 \times 10^4$	+	$2.0 \times 10^3$
		$10^8$	$2 \times 10^7$	+	$3.1 \times 10^5$
	D6-4	$10^3$	-	o	$1.5 \times 10^3$
		$10^6$	-	o	$3.5 \times 10^3$
		$10^8$	-	o	$2.8 \times 10^5$

Therefore, the rapid luminescence test for the detection of microorganisms surprisingly works more reliably in polymer dispersions than the classical growth tests.

### CLAIMS

1. Use of a bioluminescence test for the detection of microorganisms in dispersions that contain polymers and/or pigments.
2. The use according to Claim 1, characterized by the fact that the dispersions are chosen from dispersions on a vinyl chloride, butadiene, styrene or acrylate basis.
3. The use according to Claim 2, characterized by the fact that said dispersions are pure vinyl chloride, pure styrene, pure acrylate, pure butadiene, styrene-butadiene, butadiene-acrylnitrile, styrene-butadiene-acrylnitrile, styrene-acrylnitrile or acrylate-styrene dispersions.

4. The use according to one of the preceding Claims, characterized by the fact that the dispersion has a solids concentration in the range of 10 to 80% by weight.
5. A method for the detection of microorganisms in dispersions that contain polymers and/or pigments, characterized by the fact that the following steps are carried out:
  - a) a sample of the dispersion is diluted with water,
  - b) microorganism-lysing agents are added to the diluted sample and allowed to act,
  - c) a mixture of luciferin and luciferase is added, and
  - d) the luminescence of the sample is measured.
6. The method according to Claim 5, characterized by the fact that the sample of the dispersion is diluted to a ratio by weight of 1 part of polymer to 10 to 300 parts of water, in particular of 1 part of polymer to 100 to 200 parts of water.
7. The method according to Claim 5 or 6, characterized by the fact that the microorganism-lysing agents are selected from among cationic surfactants, anionic surfactants and non-ionic surfactants, in particular among cationic surfactants.
8. The method according to Claim 7, characterized by the fact that a quaternary ammonium salt is used as the cationic surfactant.
9. The method according to one of the Claim 5 to 8, characterized by the fact that a cationic surfactant is added as the microorganism-lysing agent to a diluted sample of a non-ionic or anionic dispersion.
10. The method according to one of the Claim 5 to 9, characterized by the fact that the microorganism-lysing agents are used at a concentration of 0.01 to 5% by weight.
11. The method according to one of the Claim 5 to 10, characterized by the fact that Photinus-luciferin is used as the luciferin and Photinus-luciferase as the luciferase.
12. The method according to one of the Claim 5 to 11, characterized by the fact that the microorganism-lysing agent are allowed to act for at least 5 to 20 seconds, in particular for at least 10 seconds.
13. The method according to one of the Claim 5 to 12, characterized by the fact that the luminescence is measured for at least 10 to 20 seconds, in particular for at least 15 seconds, immediately after the addition of the luciferin/luciferase mixture.

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 816 512 A1**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
07.01.1998 Patentblatt 1998/02

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C12Q 1/04**, C12Q 1/66

(21) Anmeldenummer: 97110315.5

(22) Anmeldetag: 24.06.1997

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FI FR GB IT LI NL SE

(30) Priorität: 24.06.1996 DE 19625137

(71) Anmelder:  
**BASF AKTIENGESELLSCHAFT**  
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:  
• **Balk, Roelof, Dr.**  
67459 Böhl-Iggelheim (DE)

• **Eipel, Heinz**  
64625 Bensheim (DE)  
• **Pressler, Uwe, Dr.**  
67165 Waldsee (DE)

(74) Vertreter:  
**Kinzebach, Werner, Dr. et al**  
Patentanwälte  
**Reitstötter, Kinzebach und Partner**  
Postfach 86 06 49  
81633 München (DE)

(54) **Verwendung eines Biolumineszenz-Tests zum Nachweis von Mikroorganismen in Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten**

(57) Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Biolumineszenz-Tests zum Nachweis von Mikroorganismen in Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten.

*Not on 1449  
showed it  
be?*

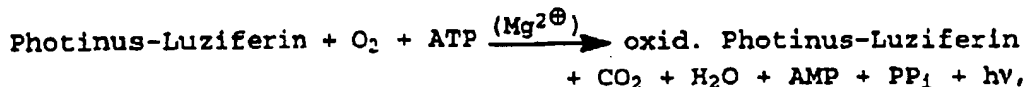
**EP 0 816 512 A1**

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Biolumineszenz-Tests zum Nachweis von Mikroorganismen in Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten.

Biolumineszenz-Reaktionen, insbesondere ATP-getriebene Lumineszenz-Reaktionen, wie die Luziferin/Luziferase-Reaktionen, sind bekannt, z.B. aus Römpf, Chemie-Lexikon, 9. Aufl., S. 425 bzw. S. 2552 f. Als Luziferasen bezeichnet man verschiedene strukturell unterschiedliche, zu den Oxidoreductasen gehörende Enzyme aus verschiedenen Organismen mit der gemeinsamen Eigenschaft, durch Oxidation von Luziferinen Biolumineszenz induzieren zu können. Luziferine sind strukturell völlig unterschiedliche Naturstoffe, die bei Einwirkung einer Luziferase Biolumineszenz erzeugen.

Am besten untersucht ist die Luziferin/Luziferase-Reaktion beim amerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis*, bei dem eine 550 Aminosäurereste umfassende Luziferase folgende Reaktion katalysiert:



wobei folgende Definitionen gelten: ATP = Adenosin-5'-triphosphat, AMP = Adenosin-5'-monophosphat,  $\text{PP}_i$  = anorg. Diphosphat,  $h\nu$  = Licht, Photinus-Luziferin = (S)-4,5-Dihydro-2-(6-hydroxybenzothiazol-2-yl)-thiazol-4-carbonsäure.

Der erste Reaktionsschritt ist eine Diphosphat-Abspaltung und Bildung von Luciferyl-Adenylat (Anhydrid zwischen Luziferin und AMP). Die Reaktion des inzwischen geklonten Enzyms läßt sich unter anderem zum schnellen und empfindlichen Nachweis von ATP (bis zu  $10^{-11}$  molaren Konz.) verwerten.

Da ATP der bedeutendste biologische Energieträger ist, kann die Luziferin/Luziferase-Reaktion auch zum Nachweis von Mikroorganismen verwendet werden, wenn diese zuvor lysiert worden sind. Unter "lysieren" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, Zellen so zu beschädigen, daß sie ATP freisetzen.

Aus der WO 96/07759 ist bekannt, daß die Lyse von Mikrobenzellen durch Behandlung mit kochendem Puffer, mit Lösungsmitteln, mit Säuren oder mit Tensiden erfolgen kann. Hinsichtlich der Lyse mit Tensiden wird darauf hingewiesen, daß ein Gemisch aus nichtionischen und kationischen Tensiden unwirksam ist, weil nichtionische Tenside Bakterien vor der Lyse durch kationische Tenside bewahren (S. 1, Z. 25-28).

Des weiteren wird in der WO 96/07759 ein Testkit beschrieben, der Luziferin, Luziferase, einen Puffer sowie ein tensidisches Lysemittel zusammen mit einer mittelkettigen Fettsäure enthält. Die Fettsäure hat den Zweck, die Luziferase vor Inaktivierung durch das tensidische Lysemittel zu schützen. Der Testkit ist zur Bestimmung von aus Mikroorganismen freigesetztem ATP geeignet. Spezielle Einsatzgebiete für diesen Testkit sind darin nicht genannt.

Ein entsprechender Testkit wird von der Anmelderin der WO 96/07759 (Fa. Celsis (GB)) in verschiedenen Variationen (z.B. "Hygiene Monitoring Kit", "Low Decay Rate Bioluminescence Kit") jedoch stets mit den gleichen Tensiden als Bestandteilen des lysierenden Mittels, vertrieben. Den Produktspezifikationen, beispielsweise für das "Low Decay Rate Bioluminescence Kit", ist zu entnehmen, daß die Anwesenheit von Tensiden in den zu untersuchenden Proben den Test stören kann. Als Anwendungsgebiete werden in den Produktspezifikationen ausschließlich die Qualitätskontrolle von Lebensmitteln, Wasser, Getränken, Kosmetika, Körperpflegemitteln und die Hygieneüberwachung von kosmetischen, pharmazeutischen und biotechnologischen Fertigungsanlagen genannt.

Die Verwendung von Biolumineszenz-Tests auf der Basis von tensidischer Lyse zum Nachweis von Mikroorganismen in Nahrungsmitteln und in Körperflüssigkeiten, wie Milch, Urin, Blut, der zentralen Rückenmarksflüssigkeit oder Speichel, ist auch aus der DE-B-2823916 bekannt.

Es liegt die Ankündigung eines am 25./26. Juni 1996 im Rahmen des "International Symposium on Industrial Applications of Bioluminescence in Microbiology" in England von Dr. Michael Cresswell (National Starch & Chemical Co. Europe) zu haltenden Vortrages mit dem Titel: "The application of ATP technology in the adhesives and polymer dispersion industries" vor. Wie, zu welchem Zweck und mit welchen Methoden die Anwendung der ATP-Technologie erfolgen soll, ist aber nicht bekannt.

Es mußte also davon ausgegangen werden, daß auf tensidischer Lyse basierende Biolumineszenz-Tests nicht zum Nachweis von Mikroorganismen in Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten, verwendet werden können, insbesondere nicht in Dispersionen, die anionische oder nichtionische Tenside enthalten. Eigene Untersuchungen bestätigen dieses Vorurteil insofern, als eine unmittelbare Anwendung bei Dispersionen mit einem Feststoffgehalt von 10 bis 80 Gew.-% und einem Gehalt an meist anionischen und/oder nichtionischen Emulgatoren von 0,1 bis 10 Gew.-%, bezogen auf den Feststoffgehalt, nicht möglich war.

So wird der Nachweis von Mikroorganismen in Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten, herkömmlicherweise durch Wachstumstests wie z.B. Easycult-TTC (erhältlich von Orion Diagnostica, Finnland) oder Agar-

Plattierung geführt. Diese Methoden funktionieren jedoch nur indirekt nach Zugabe eines Nährmediums und 24 bis 48 stündiger Inkubation bei erhöhter Temperatur (etwa 35 bis 37°C). Besonders nachteilig ist hierbei die lange Wartezeit zwischen Probenentnahme und Untersuchungsergebnis. Dies führt häufig zur prophylaktischen Anwendung desinfizierender Mittel, die teuer und toxisch nicht völlig unbedenklich sind, wenn sie z.B. in Dispersionen für Anstrichfarben verwendet werden. Außerdem können Konservierungsmittel in höheren Konzentrationen die Materialeigenschaften der Dispersionen beeinträchtigen.

Mikroorganismenbefall kann aber nicht einfach hingenommen werden, da er, neben der Geruchsbelästigung, vor allem gravierende technische Nachteile mit sich bringt. Die befallenen Dispersionen können ein verändertes Fließverhalten zeigen, was sie für die Verwendung in industriellen Lackier- oder Beschichtungsanlagen, die auf ein bestimmtes Fließverhalten der Dispersionen eingestellt sind, untauglich machen kann. Wird Druckpapier mit befallenen Dispersionen beschichtet, kann es aufgrund der verschlechterten Materialeigenschaften der Dispersion auf den schnellen Rotationsmaschinen der Druckereien reißen. Mit befallenen Dispersionen erzeugte Filme können verspröden oder sich verfärben. Da die Mikroorganismen in den Dispersionen Gasblasen bilden, kann es zu Kratern, beispielsweise in Lackfilmen auf Kraftfahrzeugkarosserien kommen. Organische Säuren, die von den Mikroorganismen gebildet werden und somit in den Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten, vorhanden sind, können Lagertanks, Fässer oder sonstige Metallgegenstände korrodieren,

Es ist demzufolge wünschenswert, mikrobielle Kontaminationen von Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten, zuverlässig und schnell erkennen und dadurch den Einsatz von Desinfektionsmitteln auf ein Minimum beschränken zu können.

Überraschenderweise wurde nunmehr gefunden, daß mittels eines auf tensidischer Lyse basierenden Biolumineszenz-Tests mikrobielle Kontaminationen auch in tensidhaltigen Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten, zuverlässig und schnell erkannt werden können.

Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung eines Biolumineszenz-Tests zum Nachweis von Mikroorganismen in Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten.

Der Biolumineszenz-Test ist erfindungsgemäß für die Untersuchung aller Arten von wäßrigen Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten, geeignet. Bevorzugt brauchbar ist er jedoch zur Untersuchung von Dispersionen auf Vinylchlorid-, Butadien- und Styrolbasis und auf Basis von Estern einer  $\alpha,\beta$ -ethylenisch ungesättigten  $C_3$ - $C_6$ -Mono- oder Dicarbonsäure, wie Acrylsäure, Methacrylsäure, Maleinsäure, Fumarsäure oder Itaconsäure, mit  $C_1$ - $C_{30}$ -Alkanolen, insbesondere  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkanolen, wie Methanol, Ethanol, n-Propanol, i-Propanol, n-Butanol, iso-Butanol, sek.-Butanol, tert.-Butanol, 2-Ethylhexyl, Decanol, Dodecanol etc. Bevorzugte Acrylate sind solche auf Basis von (Meth)acrylsäure mit  $C_1$ - $C_4$ -Alkanolen, insbesondere  $C_4$ -Alkanolen.

Es kann sich bei den Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten, um Homopolymere oder Copolymere handeln. Die Copolymere auf Basis der erwähnten Ester können mindestens ein weiteres Monomer, wie (Meth)acrylsäure, (Meth)acrylamid, N- $C_1$ - $C_6$ -Alkyl- oder N- $C_1$ - $C_6$ -Hydroxyalkylsubstituierte (Meth)acrylamide, Hydroxyalkyl(methacrylate), z.B. Hydroxyethyl(meth)acrylat, Vinylester, z.B. Vinylacetat, Vinylpropionat, vinylaromatische Verbindungen, z.B. Styrol,  $\alpha$ -Methylstyrol, und Olefine, z.B. Ethylen, Propylen oder Butadien, und (Meth)acrylnitril einpolymerisiert enthalten. Copolymere auf Styrolbasis können ebenfalls mindestens eines der genannten Monomere (die von Styrol verschieden sind) einpolymerisiert enthalten. Styrol-Butadien und Acrylat-Styrol-Dispersionen sind besonders bevorzugt.

Die Herstellung der brauchbaren Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten, kann in üblicher Weise durch radikalische Suspensions- oder Emulsionspolymerisation in Anwesenheit üblicher Initiatoren und Emulgatoren oder Schutzkolloide erfolgen, wie beispielsweise in Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th edition, vol. A21, S. 373-393 oder in Houben-Weyl, Band XIV/1, Makromolekulare Stoffe, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1961, S. 411-420 bzw. S. 192-208 beschrieben. Brauchbare Initiatoren sind insbesondere Peroxoverbindungen, wie Wasserstoffperoxid, Alkalimetallperoxodisulfate, Hydroperoxide, Dialkylperoxide, Dibenzoylperoxid etc. sowie Azoverbindungen und Redoxinitiatoren. Brauchbare Emulgatoren sind z.B. ethoxylierte Mono-, Di- und Trialkylphenole (EO-Grad: 3 bis 50, Alkylrest:  $C_4$ - $C_9$ ), ethoxylierte Fettalkohole (EO-Grad: 3 bis 50, Alkylrest:  $C_8$ - $C_{36}$ ) sowie insbesondere anionische Emulgatoren, wie Alkali- und Ammoniumsalze von Alkylsulfaten oder Alkylethersulfaten, von Alkylsulfonsäuren oder Alkyldiphenyloxidsulfonate. Weitere geeignete anionische Emulgatoren sind Bis(phenylsulfonsäure)ether bzw. deren Alkali- oder Ammoniumsalze, die an einem oder beiden aromatischen Ringen eine  $C_4$ - $C_{24}$ -Alkylgruppe tragen. Geeignete Schutzkolloide sind insbesondere Polyvinylalkohol, Cellulosederivate oder Polyvinylpyrrolidon.

Zur Verringerung des Molekulargewichtes kann die Polymerisation in Anwesenheit üblicher Regler durchgeführt werden. Brauchbare Regler sind insbesondere Aldehyde oder organische Halogen- oder Schwefelverbindungen, wie Formaldehyd, Acetaldehyd, Bromtrichlormethan, Mercaptoethanol, 2-Ethylhexylthioglycolat, Thioglykolsäure oder Dodecylmercaptan.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten, wobei man

- a) eine Probe der Dispersion mit Wasser verdünnt,
- b) Mikroorganismen-lysierende Agenzien zu der verdünnten Probe hinzufügt und einwirken läßt,
- c) eine Mischung aus Luziferin und Luziferase zugibt und
- d) die Lumineszenz der Probe mißt.

5

Der zu untersuchenden Dispersion wird eine Probe entnommen, die so verdünnt wird, daß ein Gewichtsverhältnis von etwa 1 Teil Polymer auf etwa 10 bis 300 Teile Wasser, vorzugsweise von etwa 1 Teil Polymer auf etwa 100 bis 200 Teile Wasser, vorliegt. Etwa 300 bis 500 µl dieser Probe werden in ein geeignetes Gefäß, z.B. ein Meßröhrchen gegeben, das in ein empfindliches, mit Photomultipliern versehenes Luminometer gestellt wird. Dann gibt man Mikroorganismen-lysierende Agenzien zu und läßt diese mindestens 5 bis 20 sec., vorzugsweise mindestens 10 sec. einwirken. Als Mikroorganismen-lysierende Agenzien sind die als oberflächenaktive Mittel in der DE-B-2823916 und der WO-96/07759 beschriebenen Agenzien verwendbar. Besonders bevorzugt sind kationische oder in situ kationisch wirkende Tenside, beispielsweise ethoxylierte Amine, ethoxylierte Diamine, quaternäre Ammoniumsalze eines ethoxylierten Amins sowie Mischungen davon und Fettsäure-Polyethylenglykolester, die jeweils zusammen mit einer Fettsäure mittlerer Kettenlänge eingesetzt werden können. Ganz besonders bevorzugt sind kationische Tenside wie quaternäre Ammoniumsalze. Vorzugsweise beträgt die Tensidkonzentration etwa 0,01 bis 5 Gew.-%, bezogen auf den Gesamtonsatz. Anschließend werden etwa 50 bis 150 µl, vorzugsweise 80 bis 120 µl einer Mischung aus einem Luziferin und einer Luziferase zugegeben, wobei eine Mischung aus Photinus-Luziferin und Photinus-Luziferase besonders bevorzugt ist. Die Lumineszenz wird dann mindestens 10 bis 20 sec., insbesondere mindestens 15 sec. gemessen und wie in der Luminometrie üblich in "relative light units" (RLU) ausgedrückt.

20

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie jedoch darauf einzuschränken.

#### Beispiel 1

- 25 Vergleich des Biolumineszenz-Schnelltests mit einem herkömmlichen mikrobiologischen Wachstumstest (Easycult-TTC)

Es wurden Proben verschiedener Polymerdispersionen gezogen, die mit Mikroorganismen kontaminiert waren. Verwendet wurden Dispersionen von Styrolpolymeren sowie Dispersionen von Acrylsäureester-Styrol-Copolymeren. Die genaue Zusammensetzung der Polymere, die in den Dispersionen enthaltenen Emulgatoren und Initiatoren sowie der pH-Bereich der Dispersionen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Für die Tests wurde ein von der Fa. Celsis als "Hygiene Monitoring Kit" vertriebener Satz an Reaktionsgefäßen und Reagenzien verwendet. Die Proben wurden mit vollentsalztem (Leitfähigkeit etwa 0,05 µS/cm) und über einen 0,2 µm Mikrofilter steril filtriertem Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt. Bei einem Feststoffgehalt der Dispersionen von etwa 30 bis 80 Gew.-% führte dies zu einem Gewichtsverhältnis von etwa 1 Teil Polymer auf etwa 125 bis 333 Teile Wasser. Jeweils 400 µl der verdünnten Proben wurden in ein Meßröhrchen pipettiert und in ein Luminometer des Typs Optocomp I (erhältlich von der Fa. Celsis) gestellt. Danach wurden 200 µl Lysisreagens, das als wirksame Bestandteile im wesentlichen kationische Tenside (0,2 Gew.-%), vor allem quaternäre Ammoniumsalze von ethoxylierten Aminen mit 9 bis 12 Kohlenstoffatomen in der Kette, und kleinere Mengen anionischer (0,05 Gew.-%) sowie nichtionischer (0,05 Gew.-%) Tenside enthielt, zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 10 sec. wurden 100 µl der Luziferin/Luziferase-Mischung zugegeben und die Lumineszenz nach einer Wartezeit von 0,5 sec. für eine Dauer von 15 sec. gemessen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 2 gezeigt. Zum Vergleich sind in Tabelle 2 auch die Ergebnisse des herkömmlichen Wachstumstests (Easycult-TTC) angegeben.

35

40

Eine sterile Dispersionsprobe (Nullprobe) ergab einen RLU-Wert von  $2,3 \times 10^2$ . Die in Tabelle 2 angegebenen RLU-Werte liegen deutlich höher und sind somit signifikant für den Nachweis von Mikroorganismen.

45

50

55



Tabelle 1

Dispersion	Initiator <sup>1)</sup>	pH-Bereich	Monomere <sup>2)</sup> (Gew.-%)	Emulgatoren <sup>3)</sup> (Gew.-%)	
				Typ	Menge
D1	DIHP + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	9,9-10,5	66,0 Bu 34,0 S	Koleat Arylsulfonsäurekondensat	3,90 0,80
D2	DIHP + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	10,1-10,9	61,0 Bu 39,0 S	Koleat Arylsulfonsäurekondensat	3,70 1,10
D3	DIHP + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	10,1-10,9	58,0 Bu 42,0 S	Koleat Arylsulfonsäurekondensat	3,50 1,30
D4	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	7,5-8,5	38,0 Bu 60,0 S 1,5 AS 0,5 IS	Fettalkoholsulfonat	0,67
D5	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	6,0-7,0	34,5 Bu 60,5 S 3,5 AS 1,5 AM	Fettalkoholsulfonat Bis(phenylsulfon- säure)ether	0,27 0,60
D6	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7,5-9	50,0 BA 46,0 S 2,5 AS 1,0 AM	Alkylphenoethersulfat	1,32
D7	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	7,5-8,5	48,5 BA 48,3 S 1,3 AS 1,9 NAM	Polyvinylpyrrolidon Polyvinylalkohol	1,47 2,62

Dispersion	Initiator <sup>1)</sup>	pH-Bereich	Monomere <sup>2)</sup> (Gew.-%)	Emulgatoren <sup>3)</sup> (Gew.-%)
D8	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	7-8,5	68,4 BA 29,6 S 2,0 AM	Alkylphenolethersulfat ethoxyliertes Octylphenol
D9	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	6-7	53,3 BA 28,9 AN 14,5 S 3,3 AS	Bis(phenylsulfon- säure)ether NaLS
D10	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	8,5-10	100 S	ethoxyliertes Octylphenol Arylsulfonat ethoxyliertes Alkylphenol
D11	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> + t-BHP	6-7	31,1 Bu 64,0 S 3,4 AS 1,5 AM	Bis(phenylsulfon- säure)ether NaLS

1) DIHP = Diisopropylbenzohydroperoxid, t-BHP = tert.-Butylhydroperoxid

2) Bu = Butadien, AN = Acrylnitril, MAS = Methacrylsäure, S = Styrol, AS = Acrylsäure, IS = Itacon-  
säure, AM = Acrylamid, MAM = Methacrylamid, BA = Butylacrylat

3) NaLS = Natriumlaurylsulfat

Tabelle 2

Dispersion	Wachstum Easycult-TTC Färbung <sup>1)</sup>	Lumineszenz-Schnell- test RLU
D1	++	$3,5 \times 10^4$
D2	+	$4,0 \times 10^4$
D3	+	$2,1 \times 10^4$
D4	++	$5,6 \times 10^3$
D5	+++	$4,0 \times 10^2$
D6	+	$7,3 \times 10^3$
D7	++	$9,7 \times 10^2$
D8	+	$8,1 \times 10^3$
D9	+	$1,6 \times 10^3$
D10	+	$4,1 \times 10^2$
D11	++	$8,1 \times 10^2$

<sup>1)</sup> +++ = sehr starke Rotfärbung, ++ = starke Rotfärbung, + = viele rote Punkte, o = Spur, - = negativ

## Beispiel 2

### Mikrobennachweis in Proben mit bekannter Keimzahl

Aus der Dispersion D6 (Feststoffgehalt etwa 50 Gew.-%) wurden fünf Proben entnommen, die, weil direkt aus der Produktion gezogen, steril waren. Eine Probe (0) wurde als Nullprobe belassen. Allen anderen Proben (D6-1 bis D6-4) wurden jeweils drei Teilproben entnommen, und mit  $10^3$ ,  $10^6$  bzw.  $10^8$  Mikroorganismen pro ml Probe aus einer frisch angezüchteten Stammsuspension der Mikroorganismen (Hefen und Bakterien) versetzt. D6-1 wurde mit Hefezellen der Gattung *Candida tropicalis*, D6-2 und D6-4 wurden mit Gram-negativen Bakterien (*E. coli* bzw. *Burkholderia cepacia*) und D6-3 wurde mit Gram-positiven Bakterien (*Rhodococcus erythropolis*) dotiert. Die Null- und Teilproben wurden mit herkömmlichen Wachstumstests (Agarplattierung bzw. Easycult-TTC) und nach Verdünnung im Verhältnis 1:50 (Gewichtsverhältnis etwa 1 Teil Polymer auf etwa 100 Teile Wasser) mit vollentsalztem sterilem Wasser mit dem Lumineszenz-Schnelltest untersucht. Der Lumineszenz-Test wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt, jedoch unter Verwendung des "Low Decay Rate Bioluminescence Kit" der Fa. Celsis anstelle des "Hygiene Monitoring Kit". Die Dotierungen der D6-Proben wurden durch den Lumineszenz-Test ausnahmslos nachgewiesen, die Zahl der gemessenen RLU lag um etwa eine halbe bis zwei Größenordnungen über der Zahl der für die Nullprobe gemessenen RLU. Die Wachstumstests konnten hingegen einige Kontaminationen nicht nachweisen. Die Meßergebnisse für die einzelnen Proben sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3

Dispersion	Dotierung		Wachstum		Lumineszenz-Schnelltest
	Probe	Zielmenge	Agar-Platten	Easycult-TTC <sup>1)</sup>	Verdünnung 1:50 (RLU)
		Keime/ml	Keime/ml		
D6	0	-	-	-	$5,8 \times 10^2$
	D6-1	$10^3$	$1 \times 10^2$	-	$1,1 \times 10^3$
		$10^6$	$1 \times 10^5$	-	$1,3 \times 10^3$
		$10^8$	$1 \times 10^7$	o	$4,9 \times 10^3$
	D6-2	$10^3$	$2 \times 10^2$	o	$1,1 \times 10^3$
		$10^6$	$2 \times 10^4$	+	$2,2 \times 10^3$
		$10^8$	$4 \times 10^7$	+	$4,6 \times 10^4$
	D6-3	$10^3$	$2 \times 10^1$	o	$1,5 \times 10^3$
		$10^6$	$2 \times 10^4$	+	$2,0 \times 10^3$
		$10^8$	$2 \times 10^7$	+	$3,1 \times 10^5$
	D6-4	$10^3$	-	o	$1,5 \times 10^3$
		$10^6$	-	o	$3,5 \times 10^3$
		$10^8$	-	o	$2,8 \times 10^5$

<sup>1)</sup> + = positiv, o = Spur, - = negativ

Der Lumineszenz-Schnelltest zum Nachweis von Mikroorganismen funktioniert also überraschenderweise in Polymerdispersionen zuverlässiger als die klassischen Wachstumstests.

#### Patentansprüche

1. Verwendung eines Biolumineszenz-Tests zum Nachweis von Mikroorganismen in Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Dispersionen ausgewählt sind unter Dispersionen auf Vinylchlorid-, Butadien-, Styrol- oder Acrylatbasis.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei es sich um Reinvinylchlorid-, Reinstyrol-, Reinacrylat-, Reinbutadien-, Styrol-Butadien-, Butadien-Acrylnitril-, Styrol-Butadien-Acrylnitril, Styrol-Acrylnitril oder Acrylat-Styrol-Dispersionen handelt.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Dispersion einen Feststoffgehalt im Bereich von 10 bis 80 Gew.-% besitzt.
5. Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in Dispersionen, die Polymere und/oder Pigmente enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - a) eine Probe der Dispersion mit Wasser verdünnt,
  - b) Mikroorganismen-lysierende Agenzien zu der verdünnten Probe gibt und einwirken läßt,
  - c) eine Mischung aus Luziferin und Luziferase zugibt und
  - d) die Lumineszenz der Probe mißt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Probe der Dispersion bis zu einem Gewichtsverhältnis von 1 Teil Polymer auf 10 bis 300 Teile Wasser, insbesondere von 1 Teil Polymer auf 100 bis 200 Teile

Wasser verdünnt.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mikroorganismen-lysierenden Agenzien auswählt unter kationischen Tensiden, anionischen Tensiden und nichtionischen Tensiden, insbesondere unter kationischen Tensiden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als kationisches Tensid ein quaternäres Ammoniumsalz verwendet.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man einer verdünnten Probe einer nichtionischen oder anionischen Dispersion ein kationisches Tensid als Mikroorganismen-lysierendes Agens zusetzt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mikroorganismen-lysierenden Agenzien in einer Konzentration von 0,01 bis 5 Gew.-% einsetzt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Luziferin Photinus-Luziferin und als Luziferase Photinus-Luziferase verwendet.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mikroorganismen-lysierenden Agenzien mindestens 5 bis 20 sec., insbesondere mindestens 10 sec. einwirken läßt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Lumineszenz mindestens 10 bis 20 sec., insbesondere mindestens 15 sec. unmittelbar nach Zugabe des Luziferin/Luziferase-Gemisches mißt.



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 97 11 0315

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	P. NIELSEN & E. VAN DELLEN: "Rapid bacteriological screening of cosmetic raw materials by using bioluminescence" ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTY JOURNAL, Bd. 72, Nr. 5, September 1989, Seiten 708-711, XP002044568 * das ganze Dokument *	1,5	C12Q1/04 C12Q1/66
X,P	DATABASE WPI Section Ch, Week 9729 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 97-314245 XP002044376 & JP 09 121 896 A (ASAHI BREWERIES LTD) , 13.Mai 1997 * Zusammenfassung *	1,5	
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8841 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A89, AN 88-290808 XP002044377 & SU 1 382 848 A (BIOL INSTRMN RES) , 23.März 1988 * Zusammenfassung *	1,5	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			C12Q
D,A	WO 96 07759 A (CELSIS INT PLC ;FOOTE NICHOLAS PETER MARTIN (GB); NOBLE MICHAEL (G) * das ganze Dokument *	1,5	
D,A	US 4 303 752 A (KOLEHMAINEN SEPPO E ET AL) * das ganze Dokument *	1,5	
-/--			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>DEN HAAG</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>27.Oktober 1997</b>	Prüfer <b>Moreno, C</b>
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichttechnische Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : Älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 97 11 0315

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
A	WO 94 06933 A (LAMBDATECH S A ; REMACLE JOSE (BE); RENTIER BERNARD (BE); ALEXANDRE) * das ganze Dokument * -----	1,5	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>DEN HAAG</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>27. Oktober 1997</b>	Prüfer <b>Moreno, C</b>
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundaätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)